

Einfluss der Grünlandnutzung auf die PPO-Aktivität in Rotklee

Influence of sward management on PPO activity in red clover

B. Eickler¹, M. Gierus¹ und F. Taube¹

Keywords: grassland, animal nutrition, polyphenol oxidase

Schlagwörter: Grünland, Tierernährung, Polyphenoloxidase

Abstract:

Several studies show that polyphenol oxidase (PPO) in red clover reduces proteolysis and increases nitrogen use efficiency of the ruminant, but not much is known about factors affecting PPO activity in red clover plants. PPO activity was analysed in red clover plants from legume-grass mixtures subjected to three different management systems. The cutting frequency (3 or 5 cuts) caused only minor differences in PPO activity, whereas a significant increase in PPO activity could be proved for the rotational grazing system (RG), compared to the simulated grazing system (SG, 5 cuts) with equal use frequency. Results indicate a metabolic adaptation of the red clover plants due to the grazing process itself, leading to a control factor which has to be considered in case of red clover nutrition properties.

Einleitung und Zielsetzung:

Voraussetzung für eine Verringerung der Umweltbelastung durch Stickstoffausträge und eine effiziente N-Nutzung im Grünland ist unter anderem eine verbesserte Stickstoffnutzungseffizienz (NUE) der Wiederkäuer. Bisher dominierende Futterleguminosen wie Weißklee oder Luzerne bieten hohe Futterqualität, weisen aber erhöhte Abbauraten des Rohproteins auf, die beim Wiederkäuer durch einen ungünstigen Protein-Energie-Quotienten des Futters zu einer Verringerung der NUE führen können. Während bei der Stallhaltung ein Ausgleich in der Rationsgestaltung durch Kraftfutter, Futterzusätze mit geschütztem Protein oder physikalische bzw. chemische Behandlungen des Futters erzielen lässt, ist bei der Weidehaltung eine gezielte Veränderung der UDP-Fraktion äußerst schwierig zu gestalten. In einigen Leguminosenarten vorkommende sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe wie kondensierte Tannine oder Polyphenoloxidase (PPO) wirken hemmend auf den raschen Proteinabbau in den Vormägen. Die Wirkung der Tannine ist weitgehend erforscht und es wurden entsprechende Grenzkonzentrationen im Futter ermittelt, die den gewünschten Effekt erzielen, ohne die Leistung des Tieres negativ zu beeinflussen. Für die PPO liegen noch keine vergleichbaren Daten vor, bei vielen Mechanismen und Einflussfaktoren besteht erheblicher Forschungsbedarf.

Generell ist die im Rotklee enthaltene PPO verantwortlich für die enzymatische Bräunungsreaktion vieler Pflanzen, bei der durch die Oxidation von *o*-Diphenolen sehr reaktive *o*-Quinone entstehen, welche mit weiteren Phenolen und Proteinen Komplexe bilden können. Die Rolle der PPO-Reaktion ist noch nicht vollständig geklärt, es wird aber angenommen, dass sie zum Schutz vor Fraß durch Herbivore dient. In der Wiederkäuerernährung übernehmen die Quinon-Protein-Komplexe die Funktion eines geschützten Proteins und können zu einem reduzierten Proteinabbau im Pansen und folglich zur Verbesserung der NUE beitragen (BRODERICK et al. 2001). Ergebnisse verschiedener Studien bestätigen die Wirkung der PPO-Aktivität in der Tierernährung.

¹Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Grünland und Futterbau/Ökologischer Landbau, Christian-Albrechts Universität zu Kiel, Hermann-Rodewald-Str. 9, 24118 Kiel, Deutschland, beickler@email.uni-kiel.de

In mehreren Untersuchungen wurde für Rotklee im Vergleich zu Luzerne mit vergleichbaren Proteingehalten ein verringerter Proteinabbau sowohl in Silage als auch im Pansen festgestellt und dieser Effekt auf die PPO-Aktivität im Rotklee zurückgeführt (SULLIVAN & HATFIELD 2006, JONES et al. 1995). Nach der Aufnahme von Rotklee als Futterpflanze wurde eine resultierende verbesserte NUE bei Wiederkäuern beobachtet, die durch Veränderungen der Anteile an ausgeschiedenem N in Milch, Blut und Kot belegt wurde (BRODERICK et al. 2001). Es wird angenommen, dass variierende Gehalte an PPO in Rotklee unterschiedlich starke Effekte auf die Proteinverdaulichkeit haben. Sowohl Gehalt als auch Aktivität der PPO in Rotklee können durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Unterschiede treten unter anderem zwischen verschiedenen Rotklee-Sorten auf (FOTHERGILL & REES 2005), können aber auch durch Wachstumsbedingungen oder jahreszeitliche Effekte bedingt sein. Weiterhin werden mehrere PPO-Gene in den jeweiligen Pflanzenteilen unterschiedlich stark exprimiert, weshalb die PPO-Aktivität in einer Rotkleepflanze während des Wachstums je nach phänologischem Entwicklungsstadium bzw. zum entsprechenden Zeitpunkt dominierenden Pflanzenorgan schwanken kann (SULLIVAN et al. 2004, KIM et al. 2001). So ist auch bei unterschiedlicher Nutzung von Rotkleeaufwüchsen ein variierender PPO-Gehalt bzw. -Aktivität zu vermuten. Vergleichende Studien zur PPO-Aktivität in Schnitt- und Beweidungssystemen sind nicht bekannt, es sind jedoch Einflüsse durch das Alter der Aufwüchse bzw. durch den mit der Beweidung einhergehenden Verbiss, Tritt und N-Eintrag durch Kot und Harn zu erwarten.

Methoden:

Datenbasis der Untersuchung bilden Ergebnisse eines aktuellen Projektes zur Leistungsfähigkeit von Leguminosenarten unter Beweidung und Schnittnutzung. Der Versuch wurde als Spaltanlage in vollständig randomisiertem Blockdesign mit drei Wiederholungen angelegt. Beprobt wurden im Rahmen der hier relevanten Fragestellung im Jahr 2005 als erstem Hauptnutzungsjahr die Parzellen mit Rotklee-Gras-Gemenge unter drei verschiedenen Nutzungsarten: Simulierte Beweidung (SBW) mit einer 5-Schnitt-Nutzung, Beweidung (BW) als Umtriebsweide mit einer Besatzstärke von 2 GV/ha und ebenfalls 5 Nutzungsterminen sowie Siloschnitt (Silo) mit einer 3-Schnitt-Nutzung. Zwischen den Terminen der 5-Schnitt-Nutzungen lagen jeweils etwa 30 Tage, der Siloschnitt erfolgte nach je etwa 50 Tagen. Im Falle der BW wurden die Tiere je 3-5 Tage auf den Parzellen belassen, bis ein Weiderest von etwa 20% erreicht wurde. Für das zweite Versuchsjahr 2006 wurde der Versuch ebenfalls im Vorjahr angelegt, jedoch wurde hier der Vergleich der Schnittparzellen durch eine weitere Variante mit mechanisch induziertem Stress (+MS) als Ersatz der bei der Beweidung auftretenden Belastung durch Tritt und Biss ergänzt. Hierbei wurden Parzellen mit 3- bzw. 5-Schnitt-Nutzung (SBW+MS bzw. Silo+MS) unmittelbar nach dem Schnitt mit einer Cambridge-Walze an zwei aufeinander folgenden Tagen gewalzt, um die mechanische Beschädigung durch Tritt und Biss der weidenden Tiere zu simulieren. Die Probenahmen und weitere Aufarbeitung der Pflanzen erfolgten in beiden Versuchsjahren nach gleichem Schema. Vor dem Schnitt wurde das phänologische Entwicklungsstadium in Anlehnung an FAGERBERG (1988) bonitiert, um diesen Parameter in die Auswertung einbeziehen zu können, die Daten zum Reifestadium wurden als mean stage by count (MSC) angegeben. Weiterhin wurden die Erträge ermittelt und an getrockneten Proben die üblichen Futterqualitätsparameter erhoben, wie z. B. Faser- und Rohproteingehalt, Verdaulichkeit, ME und NEL. Für die Analyse der PPO-Aktivität wurden unmittelbar vor dem jeweiligen Schnittermin bzw. Auftrieb der Tiere auf den entsprechenden Parzellen Rotkleepflanzen in einer Schnitthöhe von 5 cm beprobt, in Blatt und Stängel getrennt und sofort eingefroren, um den

aktuellen biochemischen Status zu konservieren. Die Extraktion der PPO erfolgte in Anlehnung an ESCRIBANO et al. (1997) aus gefrorenem Blattmaterial mittels Phosphatpuffer, die spezifische Aktivität wurde anschließend unter Verwendung von Kaffeesäure als Substrat photometrisch bei 400 nm über einen Zeitraum von 12 Minuten gemessen. Einzelne Beobachtungen der SBW- und BW-Systeme wurden einer Varianzanalyse unterzogen. Schnitttermine wurden als wiederholte Messung betrachtet. Unterschiede zwischen Systemen innerhalb eines Schnitttermins wurden anhand eines Student-t-Tests verglichen und die Irrtumswahrscheinlichkeiten durch den Bonferroni-Holm-Test korrigiert.

Ergebnisse und Diskussion:

Im Jahr 2005 zeigte sich im Verlauf der Vegetationsperiode bei allen Systemen ein Anstieg der PPO-Aktivität in Rotklee mit höchsten Werten beim letzten Schnitttermin (Abb. 1). Die Nutzungsfrequenz hatte hier nur einen geringen Einfluss auf die PPO-

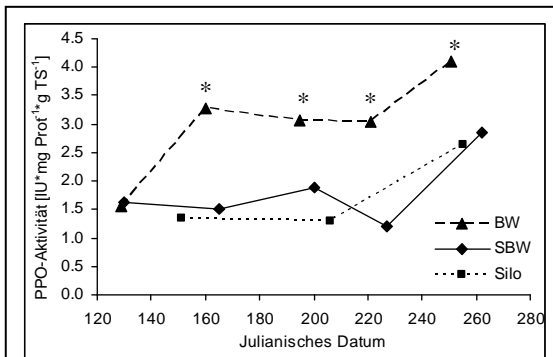


Abb. 1: Einfluss der Bewirtschaftungsform und -intensität auf die PPO-Aktivität in Rotklee. * signifikant für $P < 0,05$; $n = 30$, $SE = 0,22$.

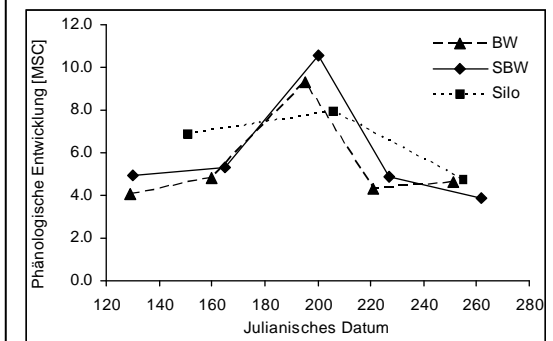


Abb. 2: Phänologische Entwicklung des Rotklee, dargestellt als MSC (mean stage by count). Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Systemen BW und SBW; $n = 29$, $SE = 0,56$.

Aktivität, wohingegen zwischen den beiden 5-Schnitt-Varianten SBW und BW deutliche Unterschiede festgestellt wurden. Rotklee beider Systeme wies zu Beginn der Nutzung gleiche Ausgangswerte der PPO-Aktivität auf, während an den Folgeterminen kontinuierlich höhere Werte in den Blättern der Pflanzen des BW-Systems gemessen wurden. Ein Vergleich der phänologischen Entwicklung ergab signifikante Unterschiede zwischen den Terminen, jedoch waren keine signifikanten Wechselwirkungen zwischen den Systemen SBW und BW nachzuweisen (Abb. 2). Ein Einfluss des phänologischen Entwicklungsstadiums der Pflanzen konnte so nicht bestätigt werden. Folglich ist die gesteigerte PPO-Aktivität auf den Beweidungsprozess selbst zurückzuführen. Es ist zu vermuten, dass durch Tritt und Verbiss, aber auch durch einen

erhöhten N-Eintrag durch die weidenden Tiere im Rotklee die Produktion von PPO als Schutz gegen Herbivore nachweisbar angeregt wird. Eine Verletzung oder Infektion von Pflanzengewebe resultiert weiterhin oft in der Synthetisierung von Phytoalexinen wie Chlorogensäure oder Kaffeesäure, welche wiederum der PPO als Substrat dienen und so eine Steigerung der Aktivität bewirken könnten.

Schlussfolgerungen:

Gesicherte Aussagen und Rückschlüsse lassen sich auf Basis der bisher nur einjährig vorliegenden gesicherten Daten nicht treffen; unsere Beobachtungen zeigen jedoch, dass hier das phänologische Entwicklungsstadium hinsichtlich der PPO-Aktivität von geringer Bedeutung ist, während unterschiedliche Nutzungssysteme einen deutlichen Einfluss auf die PPO-Aktivität in Rotklee haben können. Die Unterschiede sind auch 4 Wochen nach der jeweiligen Behandlung im Folgeaufwuchs noch messbar und können eine systemische Anpassung im Metabolismus der Pflanzen anzeigen. Für die Praxis könnte eine auf die PPO-Aktivität abgestimmte Nutzung somit als Regulationsmechanismus zu einer Verbesserung der NUE bei Wiederkäuern beitragen. Zu dieser Thematik gibt es jedoch noch umfangreichen Forschungsbedarf.

Literatur:

Broderick G. A., Walgenbach R. P., Maignan S. (2001): Production of lactating dairy cows fed alfalfa or red clover silage at equal dry matter or crude protein contents in the diet. *Journal of Dairy Science* 84:1728-1737.

Escribano J., Cabanes J., Chazarra S., García-Carmona F. (1997): Characterization of monophenolase activity of table beet polyphenol oxidase. Determination of kinetic parameters on the tyramine/dopamine pair. *J. Agric. Food Chem.* 45:4209-4214.

Fagerberg B. (1988): Phenological development in timothy, red clover and lucerne. *Acta Agric. Scand.* 38:159-170.

Fothergill M., Rees E. (2005): Seasonal differences in polyphenol oxidase activity in red clover. In: Sward dynamics, N-flows and forage utilisation in legume-based systems. Proceedings of the 2nd COST 852 workshop in Grado, Italy, 10-12 November 2005. ERSAs – Agenzia regionale per lo sviluppo rurale, Gorizia, S. 141-144.

Jones B. A., Hatfield R. D., Muck R. E. (1995): Characterization of proteolysis in alfalfa and red clover. *Crop Science* 35:537-541.

Kim J. Y., Seo Y. S., Kim J. E., Sung S.-K., Song K. J., An G., Kim W. T. (2001): Two polyphenol oxidases are differentially expressed during vegetative and reproductive development and in response to wounding in the Fuji apple. *Plant Science* 161:1145-1152.

Sullivan M. L., Hatfield R. D. (2006): Polyphenol oxidase and o-diphenols inhibit postharvest proteolysis in red clover and alfalfa. *Crop Science* 46: 662-670.

Sullivan M. L., Hatfield R. D., Thoma S. L., Samac D. A. (2004): Cloning and characterization of red clover polyphenol oxidase cDNAs and expression of active protein in *Escherichia coli* and transgenic alfalfa. *Plant Physiology* 136:3234-3244.

Archived at <http://orgprints.org/9597/>